

## JP10293129

Publication Title:

METHOD FOR MEASURING ENDOTOXIN IN PHOSPHOLIPID

Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To determine endotoxin in phospholipid accurately by emulsifying or dispersing phospholipid into water containing an anionic polymer metal salt and an alkaline metal salt, removing phospholipid from the water and then determining endotoxin in the remaining water.

**SOLUTION:** 0.01-0.5 pts.wt. of anionic polymer metal salt, e.g. sodium polyacrylate, having weight-average molecular weight of 500-30000, and 0.01-2 pts.wt. of alkaline metal salt, e.g. lithium fluoride, are added to 100 pts.wt. of sodium chloride brine. 0.1-5 pts.wt., preferably 0.5-2 pts.wt., of phospholipid derived from a natural product or synthesized phospholipid or liposome formed therefrom is then added to 100 pts.wt. of the aqueous solution and the phospholipid is emulsified or dispersed into the aqueous solution by means of a stirrer or an emulsifier. Subsequently, the phospholipid is separated and removed by filtering or centrifugal separation and the remaining aqueous solution is subjected to colorimetry thus determining endotoxin.

-----  
Data supplied from the esp@cenet database - <http://ep.espacenet.com>

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-293129

(43)公開日 平成10年(1998)11月4日

(51)Int.Cl.<sup>8</sup>  
G 0 1 N 33/579  
// A 6 1 K 9/127

識別記号

F I  
G 0 1 N 33/579  
A 6 1 K 9/127

A

審査請求 未請求 請求項の数1 O L (全 6 頁)

(21)出願番号 特願平9-101197

(22)出願日 平成9年(1997)4月18日

(71)出願人 000004341

日本油脂株式会社  
東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号

(72)発明者 金田 吉弘

兵庫県尼崎市大庄西町4-12-1

(72)発明者 岸本 洋子

兵庫県明石市魚住町錦が丘1-7-8

(72)発明者 斎藤 晃一

兵庫県尼崎市西昆陽1-31-20

(72)発明者 徳山 悟

兵庫県西宮市池開町9-2-304

(54)【発明の名称】 リン脂質中のエンドトキシン測定法

(57)【要約】

【課題】 リン脂質中のエンドトキシンをLAL成分を用いた合成基質法で正確に測定する方法を提供する。

【解決手段】 リン脂質を陰イオン性高分子金属塩およびアルカリ金属塩を含有する水中に乳化または分散した後、リン脂質を除去した残りの水のエンドトキシンを定量することを特徴とするリン脂質中のエンドトキシン測定方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】リン脂質を陰イオン性高分子金属塩およびアルカリ金属塩を含有する水中に乳化または分散した後、リン脂質を除去した残りの水からエンドトキシンを定量することを特徴とするリン脂質中のエンドトキシン測定法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、リン脂質中のエンドトキシンの測定法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】エンドトキシンは、致死性、発熱性、アジュバント作用等、多彩な生物活性を示す他、グラム陰性菌感染時のショックや、敗血症等、重篤な症状を引き起こす物質として知られている。また発熱物質としては最も強力なものであり、これの医薬品、血液製剤、ワクチンへの混入は重大な副作用の原因となり、その混入の度合いについて厳重な管理が必要となっている。リン脂質は近年ドラッグ・デリバリー・システムの一つとしてリボソーム製剤への応用が医薬品メーカーにおいて精力的に進められている。リボソーム製剤の投与方法としては現在静脈注射投与が主流である。静脈注射投与する場合、リボソーム製剤中のエンドトキシン量が非常に大きな問題となるため、日本薬局方では発熱性物質の試験項目を設け、製剤中のエンドトキシン量を規制している。したがってリボソーム製剤の基材として用いられるリン脂質中のエンドトキシンを測定する方法が求められている。

【0003】カプトガニ・アメボサイト・ライセート(Limulus Amebocyte Lysate、以下LALと略す)成分を用いたエンドトキシンの測定法としては、ゲル化法と合成基質法の二つが既に確立されている。たとえば、ゲル化法としては、プレゲル(S)〔生化学工業(株)〕やリムルス(HS)テストワコー〔和光純薬工業(株)〕など、合成基質法としては、トキシカラーシステムやエンドトキシンテスト-D〔いずれも生化学工業(株)〕などがキット化され、市販されている。

【0004】ゲル化法は、反応および測定時の振動に影響されやすく、また測定に際して主観が入りやすい。さらに、定性的な試験法であるので、定量的にエンドトキシンの濃度を求めるには、試料の希釈系列を調整しなければならないという煩雑さがあるうえに、定量精度も低いという難点がある。これに対して、合成基質法は、比色定量を行うので、客観的な測定が可能であるとともに、ゲル化法の数十倍以上の感度で定量できるすぐれた方法である。しかし、これらの測定方法は、いずれも水系で行うため、水に難溶性のリン脂質中のエンドトキシン量を測定することは困難であった。

【0005】リン脂質中のエンドトキシンの測定方法と

しては、特開平5-230083号公報に開示されている方法があるが、これは、リン脂質中のエンドトキシンを水で抽出したのち、水からリン脂質を除去し、その水に含まれるエンドトキシン量を測定する方法である。

【0006】ところが、特開平5-320043号公報には、リン脂質、コレステロール及び飽和脂肪酸からなるリボソームまたは当該リボソームを含有する水溶液が、エンドトキシン捕捉剤となることが示されており、リン脂質が水中で形成するリボソームは、エンドトキシンを捕捉する可能性があり、エンドトキシンが水中に完全には抽出されず、正確な測定値が得られない恐れがある。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記のような従来技術の問題点を解決し、リン脂質中のエンドトキシンをLAL成分を用いた合成基質法で正確に測定する方法を提供することを目的としている。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】すなわち本発明は、リン脂質を陰イオン性高分子金属塩およびアルカリ金属塩を含有する水中に乳化または分散した後、リン脂質を除去した残りの水からエンドトキシンを定量することを特徴とするリン脂質中のエンドトキシン測定方法である

## 【0009】

【発明の実施の形態】エンドトキシンの測定を行うリン脂質としては、特に制限されず、例えば大豆レシチン、卵黄レシチン、ジラウロイルホスファチジルコリン、ジミリスチルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリンなど天然物由来または合成により得られたリン脂質あるいはこれらが形成するリボソームが広く測定対象となる。リン脂質の水に対する割合は水100重量部に対して0.1～5重量部、好ましくは0.5～2重量部である。0.1重量部未満ではエンドトキシンの測定精度が悪くなり、5重量部を超えるとリン脂質と水の分離が悪くなり、エンドトキシンの測定精度も悪くなる。

【0010】本発明に用いる陰イオン性高分子金属塩としては、LAL成分とエンドトキシンの反応に影響を及ぼさないものであれば良く、例えばポリアクリル酸ナトリウム塩、ポリビニルスルホン酸ナトリウム塩、ポリスチレンスルホン酸ナトリウム塩、スチレン・マレイン酸共重合体ナトリウム塩、酢酸ビニル・マレイン酸共重合体ナトリウム塩などが挙げられる。また、その分子量は、重量平均分子量500～30000、好ましくは重量平均分子量1000～10000であり、500未満あるいは30000を超えると測定精度が悪くなる。使用量は、水100重量部に対して、0.01～0.5重量部、好ましくは0.02～0.04重量部であり、0.01重量部未満あるいは0.5重量部を超えると測定精度が悪くなる。

【0011】本発明に用いるアルカリ金属塩としては、弗化リチウム、弗化ナトリウム、弗化カリウム、塩化リチウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、臭化リチウム、臭化ナトリウム、臭化カリウム、よう化リチウム、よう化ナトリウム、よう化カリウムなどが挙げられるが、好ましくは塩化リチウム、塩化ナトリウム、塩化カリウムなどが挙げられる。使用量は、水100重量部に対して、0.01～2重量部の範囲で使うことが好ましく、0.01未満あるいは2重量部を超えると測定精度が下がる傾向がある。

【0012】本発明に用いる水はエンドトキシンの含有量が少ないものが好ましく、例えば蒸留水、注射用蒸留水、生理食塩水などが挙げられるが、好ましくは塩化ナトリウムを含有している生理食塩水である。本発明において、リン脂質と水を乳化または分散する方法は、通常用いられる攪拌機、乳化機などを使用することができる。リン脂質の除去は、逕過または遠心分離機によって行う。たとえば遠心分離の場合、回転数は高いほど分離がよくなり、分離効率および測定精度がよくなる。

【0013】

【発明の効果】本発明のリン脂質中のエンドトキシン測定法により、エンドトキシンを高い精度で定量することができる。

【0014】

【実施例】つぎに、実施例によって本発明を具体的に説明する。なお、実施例で使用した器具は、すべて250℃、5時間の加熱滅菌処理を行ったものを用いた。また、測定結果に用いた「EU」はエンドトキシン単位で、エンドトキシンによるLALのゲル化活性を表す単位である。

【0015】実施例1

100mlのスクリュ管に、ポリアクリル酸ナトリウム塩水溶液（Aldrich社製、重量平均分子量1200、45重量%）60μlを取り、生理食塩水（塩化ナトリウム0.9重量%含有、大塚製薬（株）製）を加えて全量を60mlとし試験液1を得た。この試験液1の10mlにジバルミトイルホスファチジルコリン（以下、DPPCと略す）100mgを添加して、ボルテックスミキサーで攪拌したのち、30分間超音波処理（シャープ（株）製UT-105）して乳化した。この乳化物を遠心分離機（国産遠心機（株）製H-2000C）を用いて5000rpm、30分間遠心分離し、DPPCを除去した水を得た。これを試験液2とする。また、これとは別に50mlのスクリュ管3本にエンドトキシン水溶液（100EU/ml）をそれぞれ20μl、50μl、100μlを取り、試験液1を加えてそれぞれ全量を10mlとし、さらにDPPC100mgを添加して、上記と同様の操作により、DPPCを除去した水をそれぞれ調製した。得られた各試験液を順に試験液3（エンドトキシン含有量0.02EU/ml）、試験

液4（エンドトキシン含有量0.05EU/ml）、試験液5（エンドトキシン含有量0.1EU/ml）とし、試験液1から試験液5の各100μlを用い、トキシカラーシステム（生化学工業（株）製）の操作方法に従い、545nmで比色定量を行った。結果を表1に示す。

【0016】

【表1】

表1	
試験液	エンドトキシン測定値 (EU/ml)
1	0.00021
2	0.00066
3	0.01968
4	0.04955
5	0.09630

【0017】表1から明らかなように、添加したエンドトキシンは良好に測定されており、本発明のリン脂質中のエンドトキシンの測定法により、サンプル中のエンドトキシンを簡便に測定することができた。

【0018】実施例2

50mlのスクリュ管3本に、エンドトキシン水溶液（100EU/ml）をそれぞれ20μl、50μl、100μl取り、生理食塩水（塩化ナトリウム0.9重量%含有、大塚製薬（株）製）にて全量を10mlとした。さらにそれぞれDPPC100mgを添加して、ボルテックスミキサーで攪拌したのち、30分間超音波処理（シャープ（株）製UT-105）して乳化し、それぞれ0.02EU/ml、0.05EU/ml、0.1EU/mlの濃度でエンドトキシンを含有するDPPCリボソーム溶液3種を得た。この3種のDPPCリボソーム溶液にそれぞれポリアクリル酸ナトリウム塩水溶液（Aldrich社製、重量平均分子量1200、45重量%）10μlを添加し混合後20分間超音波処理（シャープ（株）製UT-105）を行い、上記と同様の操作により、DPPCを除去した水をそれぞれ調製した。得られた各試験液を順に試験液6（エンドトキシン含有量0.02EU/ml）、試験液7（エンドトキシン含有量0.05EU/ml）、試験液8（エンドトキシン含有量0.1EU/ml）とし、それぞれ100μlを用い、トキシカラーシステム（生化学工業（株）製）の操作方法に従い、545nmで比色定量を行った。結果を表2に示す。

【0019】

【表2】

表2

試験液	エンドトキシン測定値 (EU/ml)
7	0.01816
8	0.04560
9	0.09630

【0020】表2から明らかなように、添加したエンドトキシンは良好に測定されており、本発明のリン脂質中のエンドトキシン測定法により、リボソーム中に含有されたエンドトキシンを簡便に測定することができた。

#### 【0021】比較例1

50mlのスクリー管に、注射用蒸留水（大塚製薬（株）製）10mlを取り、DPPC100mgを添加して、ボルテックスミキサーで撹拌したのち、30分間超音波処理（シャープ（株）製UT-105）して乳化した。この乳化物を遠心分離機（国産遠心機（株）製H-2000C）を用いて5000rpm、30分間遠心分離し、DPPCを除去した水を得た。これを試験液10とする。また、これとは別に50mlのスクリー管3本に、エンドトキシン水溶液（100EU/ml）をそれぞれ20μl、50μl、100μl取り、注射用蒸留水（大塚製薬（株）製）にて全量を10mlとし、DPPC100mgを添加して、上記と同様の操作により、DPPCを除去した水をそれぞれ調製した。得られた各試験液を順に試験液11（エンドトキシン含有量0.02EU/ml）、試験液12（エンドトキシン含有量0.05EU/ml）、試験液13（エンドトキシン含有量0.1EU/ml）とし、試験液10から試験液13の各100μlを用い、トキシカラーシステム（生化学工業（株）製）の操作方法に従い、545nmで比色定量を行った。結果を表3に示す。

#### 【0022】

#### 【表3】

表3

試験液	エンドトキシン測定値 (EU/ml)
10	0.00037
11	0.00234
12	0.00710
13	0.01240

【0023】表3から明らかなように、陰イオン性高分子金属塩およびアルカリ金属塩非存在下では、添加したエンドトキシンの検出率は10～15%と低く、正確な測定値が得られないことがわかる。

#### 【0024】比較例2

100mlのスクリー管に、注射用蒸留水（大塚製薬

（株）製）60mlを取り、ポリアクリル酸ナトリウム塩水溶液（Aldrich社製、重量平均分子量1200、45重量%）60μlを添加し混合して試験液14を得た。この試験液14の10mlにDPPC100mgを添加して、ボルテックスミキサーで撹拌したのち、30分間超音波処理（シャープ（株）製UT-105）して乳化した。この乳化物を遠心分離機（国産遠心機（株）製H-2000C）を用いて5000rpm、30分間遠心分離し、DPPCを除去した水を得た。これを試験液15とする。また、これとは別に50mlのスクリー管3本にエンドトキシン水溶液（100EU/ml）をそれぞれ20μl、50μl、100μl取り、試験液14にて全量を10mlとし、DPPC100mgを添加して、上記と同様の操作により、DPPCを除去した水をそれぞれ調製した。得られた各試験液を順に試験液16（エンドトキシン含有量0.02EU/ml）、試験液17（エンドトキシン含有量0.05EU/ml）、試験液18（エンドトキシン含有量0.1EU/ml）とし、試験液14から試験液18の各100μlを用い、トキシカラーシステム（生化学工業（株）製）の操作方法に従い、545nmで比色定量を行った。結果を表4に示す。

#### 【0025】

#### 【表4】

表4

試験液	エンドトキシン測定値 (EU/ml)
14	0.00021
15	0.00033
16	0.00510
17	0.01255
18	0.02740

【0026】表4から明らかなように、アルカリ金属塩非存在下では、添加したエンドトキシンの検出率は25%前後と低く、正確な測定値が得られないことがわかる。

#### 【0027】比較例3

50mlのスクリー管に、生理食塩水（塩化ナトリウム0.9重量%含有、大塚製薬（株）製）10mlを取り、DPPC100mgを添加して、ボルテックスミキサーで撹拌したのち、30分間超音波処理（シャープ（株）製UT-105）して乳化した。この乳化物を遠心分離機（国産遠心機（株）製H-2000C）を用いて5000rpm、30分間遠心分離し、DPPCを除去した水を得た。これを試験液19とする。また、これとは別に50mlのスクリー管3本にエンドトキシン水溶液（100EU/ml）をそれぞれ20μl、50

$\mu\text{l}$ 、 $100\mu\text{l}$ 取り、生理食塩水（塩化ナトリウム0.9重量%含有、大塚製薬（株）製）にて全量を $10\text{ml}$ とし、DSPC $100\text{mg}$ を添加して、上記と同様の操作により、DSPCを除去した水をそれぞれ調製した。得られた各試験液を順に試験液20（エンドトキシン含有量 $0.02\text{EU}/\text{ml}$ ）、試験液21（エンドトキシン含有量 $0.05\text{EU}/\text{ml}$ ）、試験液22（エンドトキシン含有量 $0.1\text{EU}/\text{ml}$ ）とし、試験液19から試験液22の各 $100\mu\text{l}$ を用い、トキシカラーシステム（生化学工業（株）製）の操作方法に従い、 $545\text{nm}$ で比色定量を行った。結果を表5に示す。

【0028】

【表5】

表5

試験液	エンドトキシン測定値 ( $\text{EU}/\text{ml}$ )
19	0.00021
20	0.00588
21	0.01385
22	0.02230

【0029】表5から明らかなように、陰イオン性高分子金属塩非存在下では、添加したエンドトキシンの検出率は20~30%と低く、正確な測定値が得られないことがわかる。

【0030】実施例3

$100\text{ml}$ のスクリー管に、ポリアクリル酸ナトリウム塩水溶液（Aldrich社製、重量平均分子量1200、45重量%） $60\mu\text{l}$ を取り、生理食塩水（塩化ナトリウム0.9重量%含有、大塚製薬（株）製）を加えて全量を $60\text{ml}$ とし試験液23を得た。この試験液23の $10\text{ml}$ にジステアロイルホスファチジルコリン（以下、DSPCと略す） $100\text{mg}$ を添加して、ボルテックスミキサーで攪拌したのち、30分間超音波処理（シャープ（株）製UT-105）して乳化した。この乳化物を遠心分離機（国産遠心機（株）製H-2000C）を用いて $5000\text{rpm}$ 、30分間遠心分離し、DSPCを除去した水を得た。これを試験液24とする。また、これとは別に $50\text{ml}$ のスクリー管3本にエンドトキシン水溶液（ $100\text{EU}/\text{ml}$ ）をそれぞれ $20\mu\text{l}$ 、 $50\mu\text{l}$ 、 $100\mu\text{l}$ を取り、試験液23を加えてそれぞれ全量を $10\text{ml}$ とし、さらにDSPC $100\text{mg}$ を添加して、上記と同様の操作により、DSPCを除去した水をそれぞれ調製した。得られた各試験液を順に試験液25（エンドトキシン含有量 $0.02\text{EU}/\text{ml}$ ）、試験液26（エンドトキシン含有量 $0.05\text{EU}/\text{ml}$ ）、試験液27（エンドトキシン含有量 $0.1\text{EU}/\text{ml}$ ）とし、試験液23から試験液27の各 $100\mu\text{l}$ を用い、トキシカラーシステム（生化学工業（株）

製）の操作方法に従い、 $545\text{nm}$ で比色定量を行った。結果を表6に示す。

【0031】

【表6】

表6

試験液	エンドトキシン測定値 ( $\text{EU}/\text{ml}$ )
23	0.00022
24	0.00061
25	0.01846
26	0.04725
27	0.09580

【0032】表6から明らかなように、添加したエンドトキシンは良好に測定されており、本発明のリン脂質中のエンドトキシンの測定法により、サンプル中のエンドトキシンを簡便に測定することができた。

【0033】実施例4

$50\text{ml}$ のスクリー管3本に、エンドトキシン水溶液（ $100\text{EU}/\text{ml}$ ）をそれぞれ $20\mu\text{l}$ 、 $50\mu\text{l}$ 、 $100\mu\text{l}$ を取り、生理食塩水（塩化ナトリウム0.9重量%含有、大塚製薬（株）製）にて全量を $10\text{ml}$ とした。さらにそれぞれDSPC $100\text{mg}$ を添加して、ボルテックスミキサーで攪拌したのち、30分間超音波処理（シャープ（株）製UT-105）して乳化し、それぞれ $0.02\text{EU}/\text{ml}$ 、 $0.05\text{EU}/\text{ml}$ 、 $0.1\text{EU}/\text{ml}$ の濃度でエンドトキシンを含有するDSPCリボソーム溶液3種を得た。この3種のDSPCリボソーム溶液にそれぞれポリアクリル酸ナトリウム水溶液（Aldrich社製、重量平均分子量1200、45重量%） $10\mu\text{l}$ を添加し混合後20分間超音波処理（シャープ（株）製UT-105）を行い、上記と同様の操作により、DSPCを除去した水をそれぞれ調製した。得られた各試験液を順に試験液28（エンドトキシン含有量 $0.02\text{EU}/\text{ml}$ ）、試験液29（エンドトキシン含有量 $0.05\text{EU}/\text{ml}$ ）、試験液30（エンドトキシン含有量 $0.1\text{EU}/\text{ml}$ ）とし、それぞれ $100\mu\text{l}$ を用い、トキシカラーシステム（生化学工業（株）製）の操作方法に従い、 $545\text{nm}$ で比色定量を行った。結果を表7に示す。

【0034】

【表7】

表7

試験液	エンドトキシン測定値 (EU/ml)
28	0.01802
29	0.04510
30	0.09150

【0035】表7から明らかなように、添加したエンドトキシンは良好に測定されており、本発明のリン脂質中のエンドトキシンの測定法により、リボソーム中に含まれたエンドトキシンを簡便に測定することができた。

【0036】実施例5

100mlのスクリュウ管に、ポリアクリル酸ナトリウム塩水溶液（Aldrich社製、重量平均分子量1200、45重量%）60 $\mu$ lを取り、0.45%塩化ナトリウム水溶液〔生理食塩水（大塚製薬（株）製）と注射用蒸留水（大塚製薬（株）製）を1:1の重量比で混合〕を加えて全量を60mlとし試験液31を得た。この試験液31の10mlにジミリストイルホスファチジルコリン（以下、DMPCと略す）100mgを添加して、ボルテックスミキサーで攪拌したのち、30分間超音波処理（シャープ（株）製UT-105）して乳化した。この乳化物を遠心分離機（国産遠心機（株）製H-2000C）を用いて5000rpm、30分間遠心分離し、DMPCを除去した水を得た。これを試験液32とする。また、これとは別に50mlのスクリュウ管3本にエンドトキシン水溶液（100EU/ml）をそれ

ぞれ20 $\mu$ l、50 $\mu$ l、100 $\mu$ lを取り、試験液31を加えてそれぞれ全量を10mlとし、さらにDMPC100mgを添加して、上記と同様の操作により、DMPCを除去した水をそれぞれ調製した。得られた各試験液を順に試験液33（エンドトキシン含有量0.02EU/ml）、試験液34（エンドトキシン含有量0.05EU/ml）、試験液35（エンドトキシン含有量0.1EU/ml）とし、試験液31から試験液35の各100 $\mu$ lを用い、トキシカラーシステム（生化学工業（株）製）の操作方法に従い、545nmで比色定量を行った。結果を表8に示す。

【0037】

【表8】

表8

試験液	エンドトキシン測定値 (EU/ml)
31	0.00020
32	0.00073
33	0.01982
34	0.04955
35	0.09920

【0038】表8から明らかなように、添加したエンドトキシンは良好に測定されており、本発明のリン脂質中のエンドトキシンの測定法により、サンプル中のエンドトキシンを簡便に測定することができた。